

# 三重四极杆质谱法痕量快速测定水仙花叶中的两种内源性细胞分裂素

## LCMSMS-162

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速准确测定水仙花叶中两种内源性细胞分裂素的分析方法。样品经匀浆机搅碎、过固相萃取小柱等样品前处理后，用超高效液相色谱分离，三重四极杆质谱仪进行定量分析。两种物质在 0.1~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数均为 0.9999，方法检出限在 0.004~0.006  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间，定量限在 0.013~0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间。样品加标两个不同浓度级别，所得回收率范围为 80.2%~114.1%，精密度 RSD % 范围为 3.63%~7.50%。

**关键词：**水仙花叶细胞分裂素超高效液相色谱仪三重四极杆质谱

细胞分裂素是植物众多生长发育过程中的一种重要植物激素，这些过程包括细胞分裂、芽的增值、侧芽生长、光合作用、叶绿体发育和延缓叶片衰老，几乎影响着植物体从胚胎形成到衰老的整个生长发育过程。大量的研究表明，外施细胞分裂素和提高内源细胞分裂素含量均可延缓多数植物叶片的衰老、提高植株抗逆性和种子产量。但由于外施细胞分裂素不易大田操作、成本较高等原因，在实际应用中受到较大限制。因此，精确测定植物组织中内源性细胞分裂素的含量，对进一步了解内源性细胞分裂素在植物体内的生物学作用意义重大。由于

植物基质复杂，内源性细胞分裂素含量少，植物体内各种酶的存在会导致内源性细胞分裂素在几种形式之间不断转化、代谢和降解，并且其生理效应相互促进，或者相互拮抗，对内源性细胞分裂素的定性和定量分析困难重重。因此，寻找选择性好，灵敏度高的分析方法非常迫切。

本文建立岛津超高效液相色谱与三重四极杆串联质谱联用法痕量快速测定水仙花叶中两种内源性细胞分裂素。

## 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>3</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 SP3 色谱工作站；

HLB 固相萃取柱 (CNW)；固相萃取装置 (岛津技迹)；高速冷冻离心机 (湘仪)；超声波振荡器 (泰亚赛福)；匀质器 (德国 IKA)；超纯水仪 (密理博)；旋转蒸发仪 (EYELA)；

甲醇 (色谱纯，上海安谱公司)，甲酸 (质谱级，美国 Fisher 公司)，N6-异戊烯基腺嘌呤 (标准品，百灵威科技)，6-苜基腺嘌呤 (标准品，百灵威科技)；实验室用水均为超纯水，由 Milli-Q 纯水仪制得；水仙花叶采自居家饲养。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm $\times$ 75 mm L, 1.6 $\mu\text{m}$

流动相：A- 水 (含 0.1% 甲酸)，B- 甲醇

洗脱方式：梯度洗脱 (见表 1)

流速：0.4 mL/min

进样体积：10  $\mu\text{L}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：200 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：480 $^{\circ}\text{C}$

喷雾针：0 mm

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：80 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	20%
2.00	Pumps	Pump B Conc.	60%
3.00	Pumps	Pump B Conc.	60%
3.10	Pumps	Pump B Conc.	20%
6.00	Controller	Stop	

表2 MRM 优化参数

化合物名称	英文名称	CAS号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
N6-异戊烯基腺嘌呤	N6-(delta 2-Isopentenyl) -adenine	2365-40-4	204.10	136.05*	-14.0	-16.0	-26.0
			204.10	148.00	-14.0	-14.0	-27.0
6-苄基腺嘌呤	Benzyladenine	1214-39-7	226.10	91.10*	-16.0-	-25.0	-17.0
			226.10	65.05	-16.0-	-53.0	-24.0

\* 表示定量离子

### 1.3 标准溶液配制

标准储备液：分别精密称取 N6- 异戊烯基腺嘌呤和 6- 苄基腺嘌呤对照品 0.01 g 置于 10 mL 容量瓶中，加入甲醇溶解并定容至刻度即得标准储备液 1.0 mg/mL，-18℃下保存。

标准中间液：分别取 100 μLN6- 异戊烯基腺嘌呤和 6- 苄基腺嘌呤标准储备液于 10 mL 容量瓶中用水稀释配制成混合标样浓度为 10 μg/mL 的 2 种化合物的标准中间液。

标准工作液：用水稀释上述 2 种标准化化合物的标准中间液，配成 6 个不同浓度的混合标准工作液，浓度均为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、20.0 ng/mL，采用外标法进行定量。

### 1.4 样品前处理方法

#### 1.4.1 样品提取

采摘新鲜水仙花叶片，用剪刀将其剪成面积约为 1 cm<sup>2</sup> 的形状大小，精密称取 2.0 g 水仙花叶（精确到 0.01 g），置于 50mL 聚四氟乙烯离心管中，加入 10 mL 甲醇，振荡均匀，用匀浆机捣碎均匀，以 10000 r/min 的转速离心 5 min，取上清液置于 50 mL 蒸馏瓶中。残渣加入 5 mL 甲醇进行清洗，重复上述步骤，合并两次上清液，60℃旋转蒸发至近干，以流动相甲醇和 0.1% 甲酸水（1:1，体积比）润洗蒸馏瓶并定容至 5.00 mL。

#### 1.4.1 样品净化

采用 HLB 固相萃取小柱，用 4 mL 乙腈进行预处理活化，以 4 mL 纯水平衡，添加上述提取液过柱，用 4 mL 纯水淋洗，用 2 mL 甲醇洗脱样品，流速控制在 1.0 mL/min，过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中，待 LC-MS/MS 测定。

## 结果讨论

### 2.1 质谱条件优化

为了提高仪器对内源性细胞分裂素检测的灵敏度,实验分别优化了流动相体系组成,选取甲醇和水,甲醇和水(含0.1%甲酸),甲醇(含0.1%甲酸)和水(含0.1%甲酸),甲醇和10mM乙酸铵缓冲液为实验对象,结果表明甲酸的加入具有明显促进正离子模式检测,灵敏度提高近一倍,有机相添加少量甲酸并未进一步提高信号强度,缓冲盐的加入反而抑制信号电离,最后选择甲醇和水(含0.1%甲酸)。质谱离子源参数影响到检测灵敏度,分别优化了喷雾针的位置、脱溶剂管加热温度、加热模块温度、雾化气流速和干燥气流速,最后优化后的条件见1.2分析条件中的质谱条件。

## 2.2 标准样品一级质谱图和产物离子质谱扫描图

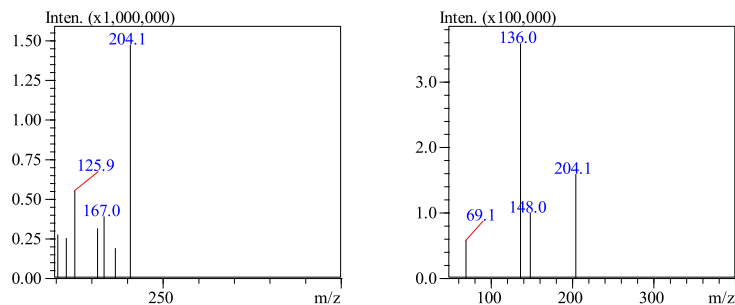


图1 N6-异戊烯基腺嘌呤的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE 值为-15V)(右图)

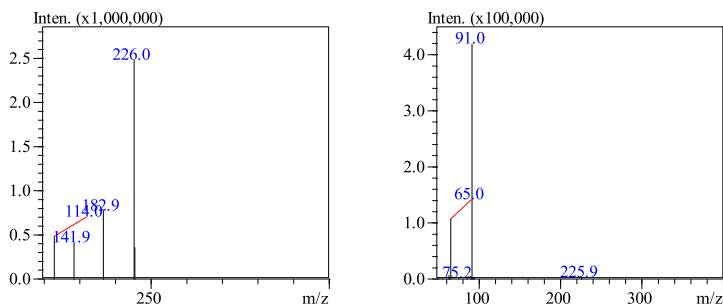


图2 6-腺基腺嘌呤的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE 值为-45V)(右图)

## 2.3 标准品的 MRM 色谱图

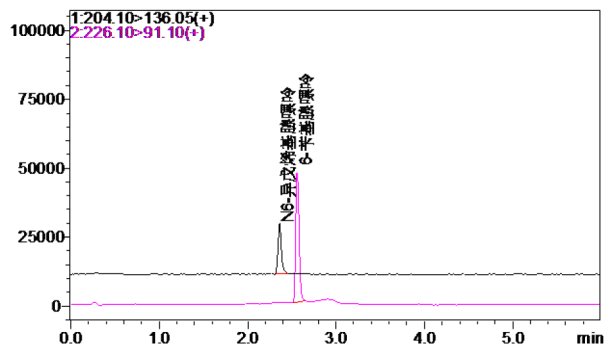


图3 两种细胞分裂素 0.5 ng/mL 的 MRM 色谱图

## 2.4 线性关系

将标准系列工作液按1.2中的分析条件进行测定,以标准溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标建立外标定量法,如图4所示,两种细胞分裂素在0.1~20 ng/mL浓度范围内,线性相关性良好,相关系数均为0.9999,准确度在88.5%~120.2%之间(见表3)。

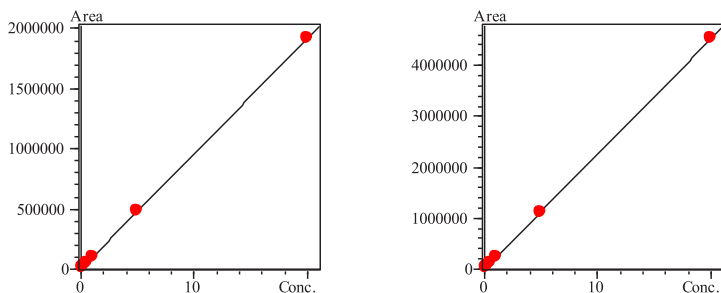


图4 N6-异戊烯基腺嘌呤(左图)和6-苄基腺嘌呤(右图)的标准工作曲线

表3 两种细胞分裂素的标准曲线

编号	化合物名称	校准曲线	准确度范围	相关系数 (R)
1	N6-异戊烯基腺嘌呤	$Y = (95730.7)X + (3536.12)$	88.5%~103.3%	0.9999
2	6-苄基腺嘌呤	$Y = (225719)X + (3077.53)$	96.8%~120.2%	0.9999

## 2.5 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样(浓度见表4),平行测定6次,两种细胞分裂素的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.10%~0.16%和1.01%~5.82%之间,结果表明系统具有良好的精密度。

表4 仪器精密度结果RSD% (n=6)

编号	化合物名称	0.2 ng/mL		1.0 ng/mL		20 ng/mL	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	N6-异戊烯基腺嘌呤	0.16	5.82	0.10	3.51	0.14	1.39
2	6-苄基腺嘌呤	0.11	3.02	0.11	2.62	0.11	1.01

## 2.6 基质加标实验

图5为水仙花叶按照1.4中样品制备方法所得MRM色谱图,由图5可知水仙花叶经过样品提取和固相萃取小柱净化后MRM色谱图较为干净,检出含有上述两种细胞分裂素。水仙花叶加标0.10 μg/kg的N6-异戊烯基腺嘌呤和0.05 μg/kg的6-苄基腺嘌呤两种细胞分裂素MRM色谱图如图6所示,基质加标该浓度样品所得信号强度在定量限以上均有很好的响应。由LabSolutions软件算出信噪比,按照3倍信噪比和10倍信噪比计算方式分别作为检出限和定量限,计算所得结果为N6-异戊烯基腺嘌呤方法检出限为0.006 μg/kg,定量限为0.02 μg/kg;6-苄基腺嘌呤方法检出限为0.004 μg/kg,定量限为0.013 μg/kg。

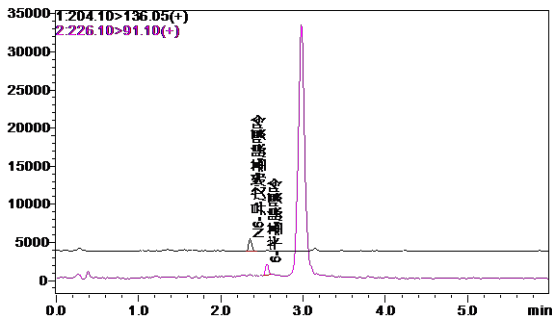


图5. 水仙花叶细胞分裂素检测MRM色谱图

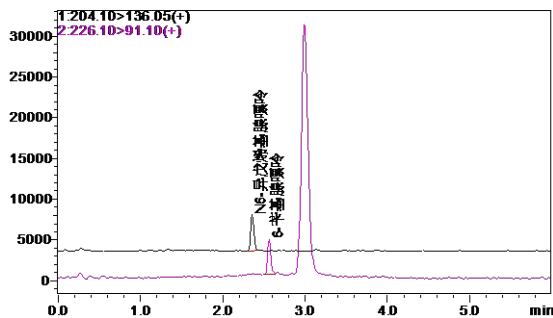


图6. 样品加标MRM色谱图

表5 水仙花叶 加标两种细胞分裂素回收率结果 (n=3)

化合物名称	检出浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 (%)	RSD%
N6-异戊烯基腺嘌呤	0.008	0.1	90.6	3.87
		5.0	91.0	5.21
6-苄基腺嘌呤	0.004	0.05	80.2	7.50
		2.5	114.1	3.63

## ■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速测定水仙花叶中两种内源性细胞分裂素的分析方法。两种目标物在 0.1~20 ng/mL 浓度范围内线性良好, 相关系数均为 0.9999, 方法检出限在 0.004~0.006  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间, 定量限在 0.013~0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间。样品加标两个不同浓度级别, 所得回收率范围为 80.2%~114.1%, 精密性 RSD % 范围为 3.63%~7.50%。实验结果表明使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用仪建立该分析方法具有快速、灵敏度高, 可以满足定量检测需求。